



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 183 749**

⑫ Número de solicitud: 200102067

⑤① Int. Cl.⁷: **A21D 8/04**
C12N 1/16
//(C12N 1/16
C12R 1:85)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **14.09.2001**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2003**

Fecha de la concesión: **14.05.2004**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2004**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.08.2004

⑦③ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Valencia**

⑦② Inventor/es: **Randez Gil, María Francisca;
Prieto Alamán, José Antonio y
Hernández López, María José**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces.**

⑤⑦ Resumen:

Utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces.

La presente invención consiste en la utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces congeladas. Estas cepas presentan un crecimiento rápido y alto rendimiento de biomasa en medios de melaza, acoplado a una buena capacidad fermentativa en masas dulces y saladas, tanto frescas como congeladas. Además, la utilización de estas cepas tiene ventajas adicionales, ya que una sola cepa puede ser utilizada en diferentes tipos de formulaciones panarias, incluidas aquellas que contienen sal.

ES 2 183 749 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces.

Sector de la técnica

Industria alimentaria. Producción de masas dulces y saladas. La presente invención consiste en la utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces congeladas. Estas cepas, además de resistencia a la congelación, presentan un buen poder fermentativo en formulaciones con un elevado contenido en sacarosa.

Estado de la técnica

La capacidad de las levaduras de panadería para enfrentarse a diferentes condiciones de estrés es un factor clave en muchas aplicaciones comerciales. Uno de los retos más extremos para las levaduras es la alta presión osmótica encontrada en masas dulces (Attfield, 1997; Randez-Gil y col., 1999). Estos productos contienen hasta un 30 % de sacarosa, a menudo combinado con grasa, leche y sal, lo que contribuye a reducir la actividad de agua en la masa.

La exposición a estrés osmótico supone una rápida deshidratación celular que limita el crecimiento y la capacidad de producción de gas (Blomberg y Adler, 1992; Hohmann, 1997). Como consecuencia de ello, el tiempo de fermentación se alarga y el volumen del producto final disminuye (Myers y col., 1997). Esta situación se ve empeorada en masas dulces congeladas, ya que el proceso de congelación y descongelación reduce notablemente la actividad de agua. Además, el almacenamiento en congelación tiene un efecto negativo en el proceso de panificación, debido al daño celular por crecimiento de los cristales de hielo (Gelinas y col., 1993; Hatano y col., 1996). Para resolver estos problemas es común en la práctica panadera aumentar la dosis de levadura en masas dulces y masas dulces congeladas. Sin embargo esta práctica incrementa el coste del proceso y afecta de forma negativa al sabor y textura del producto. En este sentido, se han llevado a cabo numerosos esfuerzos para desarrollar nuevas cepas de levadura con mayor poder fermentativo en masas congeladas (EP0921190, EP0838520 A3, EP0196233, JP5064581, JP3285673, EP1036841). Sin embargo, la mayoría de estas cepas no han sido evaluadas para otras propiedades de interés en panificación o no cumplen los principales requisitos de una levadura de panadería comercial.

Una característica importante que influye en la capacidad fermentativa de una levadura destinada a elaborar masas dulces es su nivel de actividad invertasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa más fructosa, lo cual incrementa la presión osmótica. Por ello, cepas de levadura de panadería con baja actividad invertasa han sido seleccionadas para la producción de masas dulces (US5801049). Estas cepas son óptimas para la elaboración de masas con una baja concentración de sacarosa (<10 %). Ahora bien, estas cepas no muestran osmotolerancia intrínseca y en condiciones de alta presión osmótica, su actividad fermentativa se ve inhibida.

Por otra parte, la incorporación de sal (2 %) a la formulación de masas dulces tiene efectos adi-

cionales sobre la capacidad fermentativa de la levadura. La acumulación de sodio y cloro en el citosol es nociva para muchos sistemas enzimáticos. Este efecto tóxico se observa a concentraciones intracelulares de Na^+ y Cl^- de 50-100 mM, inferiores a las concentraciones requeridas para producir estrés osmótico (Serrano y col., 1997). Las concentraciones consideradas nocivas se alcanzan fácilmente en la levadura, dada la baja actividad de agua en masas dulces, lo que incrementa la concentración efectiva de estos iones. Por todo ello, una cepa industrial destinada a la elaboración de masas dulces debe exhibir osmotolerancia y resistencia a la toxicidad del sodio. A pesar de los numerosos esfuerzos, en la actualidad no se dispone de ninguna cepa que cumpla con estos dos requisitos.

La capacidad de fermentar una masa panaria, no es exclusiva de *Saccharomyces cerevisiae*. Levaduras como *Zigosaccharomyces*, *Pichia* o *Torulaspora* han sido aisladas de masas fermentadas de arroz o de centeno (Almeida y Pais, 1996). Una de estas levaduras, en particular *T. delbrueckii*, es empleada de forma comercial en Japón para la fermentación panaria. Cepas tolerantes a la congelación de *T. delbrueckii* (JP5244934, JP6078754, EP0268012A1) *T. pretoriensis* y *Kluyveromyces thermotolerans* han sido aisladas y caracterizadas como adecuadas para masas congeladas. Sin embargo, la mayoría de estas cepas no han sido extensamente evaluadas o no cumplen requisitos importantes para su posterior comercialización.

Descripción de la invención

Breve descripción

La presente invención supone una importante mejora en el proceso productivo de masas dulces frescas y congeladas, basado en la utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii*. La utilización de las cepas de *Torulaspora delbrueckii* descritas en esta invención para el proceso de producción de masas dulces frescas y congeladas, ha sido reivindicado en la presente invención.

Las cepas de *Torulaspora delbrueckii* descritas en esta invención cumplen los requisitos más importantes de una cepa de uso comercial en panificación: crecimiento rápido y alto rendimiento de biomasa en medios de melaza, acoplado a una buena capacidad fermentativa en masas dulces y saladas, tanto frescas como congeladas. Estas características responden a las demandas de los productores y consumidores de este tipo de masas. Además, la utilización de estas cepas tiene ventajas adicionales, ya que una sola cepa puede ser utilizada en diferentes tipos de formulaciones panarias, incluidas aquellas que contienen sal. La utilización de estas cepas que presentan una alta capacidad fermentativa, tanto en masas dulces como en masas saladas, y que por tanto evitan la necesidad de emplear cepas distintas para el proceso de producción de cada uno de estos dos tipos de masas, ha sido reivindicada en la presente invención.

Estas cepas de *T. delbrueckii* han demostrado su capacidad fermentativa en masas dulces que contienen ingredientes como leche, huevo, margarina o emulgentes. La utilización de estas cepas en este tipo de masas ha sido también reivindicada en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Las levaduras *T. delbrueckii* IGC5321 e IGC5323 fueron aisladas y caracterizadas parcialmente por Almeida y Pais (1996). Estos autores han demostrado la buena capacidad fermentativa de estas cepas en masas saladas congeladas. Sin embargo, no aparece en dicho trabajo ninguna referencia a la producción de masas dulces frescas o congeladas. Tampoco se describe la producción de biomasa en medios industriales limitándose su crecimiento a medios sintéticos.

Uno de los principales requisitos de una cepa industrial de panadería es un crecimiento rápido y un buen rendimiento de biomasa en medios industriales de melaza. Como se observa en los datos presentados en la figura 1, las cepas de *Torulaspora delbrueckii* IGC5321 e IGC5323 crecen en medio de melaza con una velocidad de crecimiento de (0.29 h^{-1}) y de (0.28 h^{-1}) respectivamente, similar a la encontrada para cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* Plus Vital y Cinta Roja (0.32 h^{-1}). En estas condiciones de cultivo se obtiene un rendimiento en biomasa similar al observado en cepas comerciales (ver tabla 1).

TABLA 1
Rendimiento en biomasa de diferentes cultivos de levadura en medio melaza*

Cepa	Gramos por litro (s.h.)
<i>T. delbrueckii</i> (IGC5321)	24.5
<i>T. delbrueckii</i> (IGC5323)	22.2
Cinta Roja	26.5
Plus Vital	24.2

* El cultivo se llevó a cabo a 30°C y 200 r.p.m. Las células se inocularon a una $\text{D.O.}_{600} = 0.05$ y se determinó la producción de biomasa tras 24 horas de cultivo. s.h.: sustancia húmeda

La biomasa así obtenida ha sido utilizada para la producción de masa panaria y masa dulce, de acuerdo con la formulación descrita en la tabla 2, utilizando una harina con una energía de deformación (W) de $13.82 \times 10^{-3} \text{ J}$ (determinada en el alveógrafo).

TABLA 2
Formulación de masas dulces y saladas

Ingredientes	Masa salada	Masa dulce	
		8 % azúcar	20 % azúcar
Harina	250 g	250 g	250 g
Levadura	7 g	7 g	7 g
Sal	5 g	5 g	5 g
Azúcar	-	20 g	50 g
Agua	118 ml	118 ml	118 ml

Como se recoge en la tabla 3, las cepas de *Torulaspora* estudiadas son capaces de fermentar tanto masas saladas como dulces. En especial, la cepa IGC5321 presenta los niveles más altos de

producción de gas, incluso en masas con un contenido del 20 % de sacarosa. En estas condiciones las cepas comerciales de *S. cerevisiae* Plus Vital y *S. cerevisiae* Cinta Roja muestran una clara disminución de su capacidad fermentativa.

TABLA 3
Producción de CO_2 en masas panarias y masas dulces

Cepa	ml de CO_2 /g de levadura (s.s)		
	Masa salada	Masa dulce	
		8 % azúcar	20 % azúcar
<i>T. delbrueckii</i> IGC5321	811	840	529
<i>T. delbrueckii</i> IGC5323	780	765	525
Plus Vital	585	699	158
Cinta Roja	719	529	n.d.*

Las masas panarias se elaboraron de acuerdo a lo descrito en el capítulo de "Ejemplo de realización de la invención". La producción de CO_2 se determinó en un Rheofermentómetro (Chopin).

s.s.: sustancia seca

* no detectado

Una característica importante que determina la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* en masas saladas o con un contenido bajo en sacarosa es el nivel de actividad invertasa y maltasa. Así, la fermentación de masas dulces está inversamente correlacionada con el nivel de actividad invertasa (US5801049), mientras que en el caso de masas saladas un buen poder fermentativo está correlacionado con un nivel elevado de actividad maltasa (Beudeker y col., 1990; Oliver, 1991). Como se muestra en la figura 2, las cepas de *Torulaspora* estudiadas presentan valores más bajos de actividad maltasa que las cepas comerciales de *S. cerevisiae* analizadas. Este resultado no se correlaciona con la producción de CO_2 en masas saladas determinada para estas levaduras (Tabla 3). Sin embargo, cuando analizamos el nivel de actividad invertasa podemos comprobar que las cepas con niveles más bajos de esta enzima son las que muestran un mejor poder fermentativo en masas dulces. En este sentido, la cepa de *S. cerevisiae* comercializada para la fabricación de masas saladas (Cinta Roja), es la que presenta el mayor nivel de actividad invertasa y esto claramente implica una baja capacidad fermentativa en formulaciones con dosis elevadas de azúcar.

En el caso de formulaciones con un contenido del 20 % en sacarosa la presión osmótica es muy elevada, por lo que un bajo nivel de actividad invertasa no es suficiente para mantener la fermentación (Tabla 3). Además, como se observa en la figura 3, la presencia de sal en las formulaciones ensayadas disminuye la capacidad fermentativa de la levadura. Este efecto es más acusado en la cepa Plus Vital, en la que la disminución de

la capacidad fermentativa va acompañada de una fase de latencia, con lo que se alarga el tiempo de fermentación.

A la vista de estos resultados, estas levaduras se han sometido a diferentes condiciones de estrés osmótico y salino. Se ha estudiado su capacidad de crecimiento en medios de cultivo conteniendo sales como NaCl (1.4 M), KCl (1.4 M) o LiCl (0.4 M). Como se muestra en la figura 3B, el crecimiento de la cepa Plus Vital se ve perjudicado por la presencia de una elevada concentración de KCl y totalmente abolido por LiCl o NaCl. En medios con 20 % de sacarosa y 0.7 M de NaCl, de nuevo la capacidad de crecimiento de esta cepa se ve claramente afectada. Sin embargo, la cepa de *T. delbrueckii* IGC5321 muestra un buen crecimiento en estos medios, incluso en presencia de NaCl o LiCl, indicando que esta cepa es osmotolerante y resistente a la toxicidad del sodio. Estos resultados se corresponden bien con su alta capacidad fermentativa en masas dulces.

La resistencia a la congelación es una propiedad esencial en cepas comerciales de levadura para su utilización en masas congeladas. La pérdida de la capacidad fermentativa tras el proceso de congelación-descongelación se ha atribuido a la desecación y consecuente pérdida de electrolitos generada por estrés hiperosmótico (Hatano y col., 1996; Myers y Attfield, 1999). Además, a lo largo del almacenamiento en congelación, se produce un crecimiento de los cristales de hielo y como consecuencia de ello, la fractura de la membrana celular y de los orgánulos intracelulares (Grout y col., 1990). Con el objeto de determinar cómo afectan estos dos procesos a la producción de gas, se analizó la capacidad fermentativa de las cepas bajo estudio, en masas dulces o saladas almacenadas en congelación durante diferentes periodos de tiempo. Como se observa en la figura 4, las cepas comerciales de *S. cerevisiae* disminuyen su capacidad fermentativa durante el proceso de congelación-descongelación, de un 25 a un 40 %, tanto en masas dulces como saladas (tiempo 0'). Por el contrario esta reducción fue tan solo del 10-12 % en masas elaboradas con *T. delbrueckii* IGC5321. Este resultado está en concordancia con la aparente osmotolerancia intrínseca que presenta esta cepa de *T. delbrueckii*. Finalmente, todas las cepas estudiadas muestran una clara disminución gradual de su poder fermentativo con el tiempo de almacenamiento en congelación, siendo más acusado para las cepas comerciales de *S. cerevisiae* analizadas en este estudio.

La mayoría de las masas dulces producidas en la industria contienen ingredientes como huevo o margarina. Siguiendo la formulación indicada en la tabla 4, se elaboraron masas con las cepas Plus Vital y *T. delbrueckii* IGC5321, en las cuales se determinó la producción de CO₂ en fresco y tras diferentes periodos de almacenamiento en congelación. De nuevo, como se muestra en la figura 5, *T. delbrueckii* IGC5321 mostró una mejor producción de gas, medida a través del incremento de volumen, que la cepa control Plus Vital.

TABLA 4
Formulación de una masa tipo "brioix"

Ingredientes		
5	Harina*	100 g
	Levadura	9 g
	Agua	23 ml
10	Sal	1,5 g
	Azúcar	18 g
	Huevo entero batido pasteurizado	12 g
15	Clara de huevo pasteurizada	20 g
	Leche en polvo	1 g
	Margarina	10 g
	Emulgente (80 % lecitina y 20 % DATEM)	1 g

* W=40.0 x 10⁻³ J (alveógrafo)

Descripción del contenido de los dibujos

Figura 1: Curva de crecimiento a 30°C en medios industriales de melaza de las cepas de *Torulaspora delbrueckii* IGC5321 (●) e IGC5323 (○) y de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Cinta Roja (■) y Plus Vital (□).

Figura 2: Nivel de actividad invertasa y maltasa detectado en levaduras crecidas en medios industriales de melaza. Células de *Torulaspora delbrueckii* IGC5321 (Td21), *Torulaspora delbrueckii* IGC5323 (Td23), Cinta Roja (CR) y Plus Vital (PV) fueron cultivadas en medio melaza (DO₆₀₀ = 24-26) y procesadas para la determinación de actividades enzimáticas, siguiendo el procedimiento descrito por Niederacher y Entian (1987). Los valores representan la media de al menos dos experimentos independientes.

Figura 3: Efecto de la adición de diferentes sales en el crecimiento y capacidad fermentativa de las levaduras ensayadas en este estudio. (A) Incremento en el volumen de la masa a lo largo del tiempo de fermentación de una masa salada (panel izquierdo) y de una masa dulce (panel derecho) elaborada con la cepa Plus Vital (□, PV) o con la cepa *T. delbrueckii* IGC5321 (●, Td21). (B) Comparación del crecimiento de estas cepas de levadura de panadería en medio sintético, YP-agar (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % de agar), suplementado con 2 % glucosa (YPD) o 20 % de sacarosa (YPS) y diferentes sales, NaCl, KCl o LiCl. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 2-4 días.

Figura 4: Efecto de la congelación y del almacenamiento sobre la capacidad fermentativa de diferentes cepas de levadura de panadería. Masas saladas (A) y masas dulces (B) elaboradas con las levaduras *T. delbrueckii*, IGC5321 (●) e IGC5323 (○) y *S. ce-*

revisiae, Cinta Roja (■) y Plus Vital (□), fueron congeladas a -80°C durante 1 hora y almacenadas a -20°C durante 3 horas (0') o hasta 90 días. Los valores representan la cantidad relativa de gas producido respecto a una masa control no congelada y son media de dos experimentos independientes.

Figura 5: Producción de gas en masas tipo "brioix" frescas y congeladas. Incremento en el volumen de la masa a lo largo del tiempo de fermentación de una masa elaborada con la cepa *T. delbrueckii* IGC5321 (negro) o con Plus Vital (blanco).

Ejemplo de realización de la invención

1. Producción de biomasa

En esta invención, la producción de biomasa de levadura se ha llevado a cabo en frascos de 1 litro conteniendo 250 ml de medio de cultivo de melazas con la siguiente composición: 116.6 g de melaza de remolacha (con un contenido del 49 % sacarosa), 1.5 g de sulfato amónico, 0.15 g de ácido ortofosfórico y 20 µg de biotina por litro.

El medio se ajustó a pH 5.0 con 1M HCl.

El medio de cultivo es inoculado a una D.O.₆₀₀ inicial de 0.05 a partir de un precultivo en el mismo medio. Tras 24 horas de cultivo a 30°C y 200 rpm, la levadura es recogida mediante centrifugación y lavada con agua para eliminar los restos de melaza. Posteriormente es filtrada a través de una placa porosa, obteniéndose una pastilla de levadura con un contenido en humedad en tomo al 72 %.

2. Elaboración de masas y proceso de congelación

Las masas descritas en la presente invención se han elaborado siguiendo la formulación presentada en la tabla 2. Los distintos ingredientes se han añadido en sólido con la excepción del azúcar y la levadura, que se han desleído en el agua que se aporta en la formulación. Se amasó en una amasadora MAHOT LABO 25 MIXER durante 8 minutos a alta velocidad. Se dividió en piezas de 315 g y se moldeó a mano hasta conseguir una lámina de masa de 0.5 cm de espesor, que se introdujo en bandejas de aluminio envueltas en plástico. Finalmente, se congeló a -80°C durante 1 hora y se almacenó en una cámara de congelación a -20°C.

3. Producción de CO₂

Se determinó en un rheofermentómetro (Chopin) durante 3 horas a 28.5°C. En todos los casos se analizó la producción de gas en una pieza sin congelar a la que denominamos "masa control". El resto de piezas almacenadas en congelación se analizaron de la misma manera, tras su descongelación en una cabina de fermentación durante 30 minutos a 30°C.

4. Efecto de la congelación/descongelación

La tolerancia a la congelación se compara con la presentada por otras cepas de panadería comerciales, crecidas en las mismas condiciones. Las masas, tanto saladas (4A) como dulces (4B), fueron congeladas a -80°C durante 1 hora y almacenadas a -20°C durante 3 horas (0') o hasta 60 días. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.

5. Efecto de otros ingredientes en las masas tipo "brioix"

Se elaboraron masas con la formulación presentada en la tabla 4, preparándose según el proceso descrito en el punto 2. Se midió el incremento en el volumen de las masas elaboradas con la cepa *T. delbrueckii* IGC5321, tanto frescas como congeladas durante el período de tiempo indicado en la figura 5 y se comparó con el incremento del volumen en las mismas condiciones de la masa fermentada con la cepa Plus Vital.

6. Efecto del estrés osmótico y salino en la capacidad fermentativa y en el crecimiento de cepas de levadura de panadería

Las cepas *T. delbrueckii* IGC5321 y Plus Vital se crecieron en medio YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % glucosa) hasta fase exponencial (D.O.₆₀₀ = 0.3-0.5), se recogieron por centrifugación, se diluyeron y se plaquearon en YPD sólido (2 % agar) conteniendo NaCl (1.4 M), KCl (1.4 M) o LiCl (0.4 M). Además se ensayó el crecimiento en placas de YP conteniendo 20 % de sacarosa en ausencia de NaCl o en presencia de 0.7 M de NaCl. Las placas se incubaron a 30°C durante 2 a 4 días.

La presencia de 2 % de sal en formulaciones de masa dulce conteniendo 20 % de sacarosa, disminuye la capacidad fermentativa de las dos levaduras ensayadas como se observa en la figura 3 A, siendo este efecto mucho más acusado para la cepa Plus Vital. El incremento de volumen de la masa se ha medido en un vaso calibrado usando masas de 100 g. elaboradas como se especifica en el punto 2.

Bibliografía

Almeida, M. J., and C. S. Pais. 1996b. Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4401-4404.

Attfield, P. V. 1997. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnol.* **15**:1351-1357.

Beudeker, R.F.; Dam, H.W.; van Plaats J.B. van der; Vellenga, K. (1990) *Developments in baker's yeast production*. In Verachtert, H.; De Mot, R. (eds) *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis*. Dekker, New York p. 103-146.

Blomberg, A., and L. Adler. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Phys.* **33**:145-212.

Gélinas, P., Lagimodière, M., and Dubord, C. 1993. Baker's yeast sampling and frozen dough stability. *Cereal Chem.* **70**:219-225.

Grout, B.; J. Morris y M. McLellan. 1990. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends Biotechnol.* **8**:293-297.

Hatano, S., Udou, M., Koga, N., Honjoh, K., and Miyamoto, T. 1996. Impairment of the glycolytic system and actin in baker's yeast during frozen storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**:61-64.

Hohmann, S. 1997. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress, p. 101-146. In S. Hohmann and W. H. Mager (ed.), *Yeast Stress Responses*. Springer, New York.

Myers, D. K., D. T. M. Lawlor, and P. V.

Attfield. 1997. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. **63**:145-150.

Myers, D.K. y P.V. Attfield. 1999. Intracellular concentration of exogenous glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* provides for improved leavening of frozen sweet doughs. Food Microbiol. **16**: 45-51.

Niederacher, D. y Entian, K.-D. 1987 Isolation and characterization of the regulatory *HEX2* necessary for glucose repression in yeast. Mol. Genet. **206**:505-509.

Oliver, S. (1991) Classical yeast biotechnology. In Tuite M.F.; Oliver S.G. (eds) *Saccharomyces. Biotechnology handbooks* Vol. 4 Plenum Press, London p. 213-248.

Randez-Gil, F., Sanz, P., and Prieto, J.A. 1999. Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.* **17**:237-244.

Serrano, R., J. A. Márquez, and G. Ríos. 1997. Crucial factors in salt stress tolerance, p. 147-169. In S. Hohmann and W. H. Mager (ed.), *Yeast Stress Responses*. Springer, New York.

EP0921190 (Katumi, M. y col. Solicitante: Oriental Yeast Co Ltd. Fecha de publicación 1999-06-09). Frozen dough-resistant and high-sugar dough-resistant, practical baker's yeast.

EP0838520, A3 (Chie, I. y col. Solicitante: Oriental Yeast Co Ltd. Fecha de publicación 1998-04-29). Frozen dough-resistant, practical baker's yeast.

EP0196233 (Kazuo, U. y col. Solicitante: Kyowa Hakko Kogyo KK. Fecha de publicación 1986-10-01). Freeze resistant dough and novel microorganism for use therein.

JP5064581 (Sueo, I. y col. Solicitante: Kanegafuchi Chem Ind Co Ltd. Fecha de publicación 1993-03-19). New yeast, frozen bread dough containing the yeast, and production of the dough.

JP3285673 (Sueo, I. y col. Solicitante: Kanegafuchi Chem Ind Co Ltd. Fecha de publicación 1991-12-16). New yeast, frozen bread dough containing same yeast and preparation of same dough.

US5,801,049 (Endo y col. Solicitante: Asahi Chemical Ind. Fecha de publicación 1998-09-01). Freeze-resistant baker's yeast having sugar resistance.

EP1036841A1 (Ando, M. y col. Solicitante: Oriental Yeast Co Ltd. Fecha de publicación 2000-09-20). Sugar super-tolerant yeast for confectionery and bakery.

EP0268012A1 (Trivedi, N. y col. Solicitante: Universal Foods Corp. Fecha de publicación 1988-05-25). Frozen yeast dough products.

JP5244934 (Osamu, Y. y col. Solicitante: Nippon Sanso KK. Fecha de publicación 1993-09-24). Baker's yeast and frozen bread dough prepared by using the yeast.

JP6078754 (Yosuke, S. y col. Solicitante: Nikka Uisukii KK. Fecha de publicación 1994-03-22). *Torulaspora delbrueckii* H299-18 and production of frozen dough for bread using the same.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de las levaduras *Torulaspora delbrueckii* IGC5321 e IGC5323 para la fermentación de masas dulces.

2. Utilización de las levaduras según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la masa dulce tiene un contenido en sacarosa menor al 10 %.

3. Utilización de las levaduras según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizada** porque la masa dulce es fresca o congelada.

4. Utilización de la levadura *T. delbrueckii* IGC5321 según la reivindicación 1 para la fermentación de masa dulce **caracterizada** porque

la masa tiene un contenido en sacarosa del 10 al 20 %.

5. Utilización de la levadura *T. delbrueckii* IGC5321 según la reivindicación 4 **caracterizada** porque es una masa fresca o congelada.

6. Utilización de las levaduras según las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizada** porque la masa dulce contiene en su formulación además de sacarosa los ingredientes: leche, huevo, margarina o emulgentes.

7. Utilización de las levaduras según la reivindicación 6 **caracterizada** porque la masa dulce es fresca o congelada.

15

20

25

30

35

40

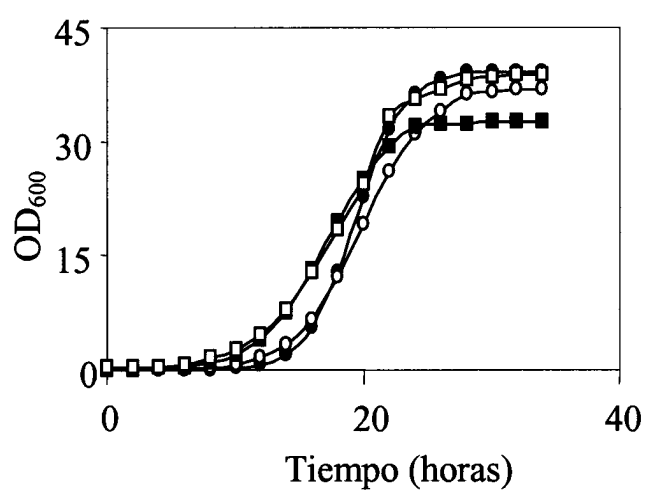
45

50

55

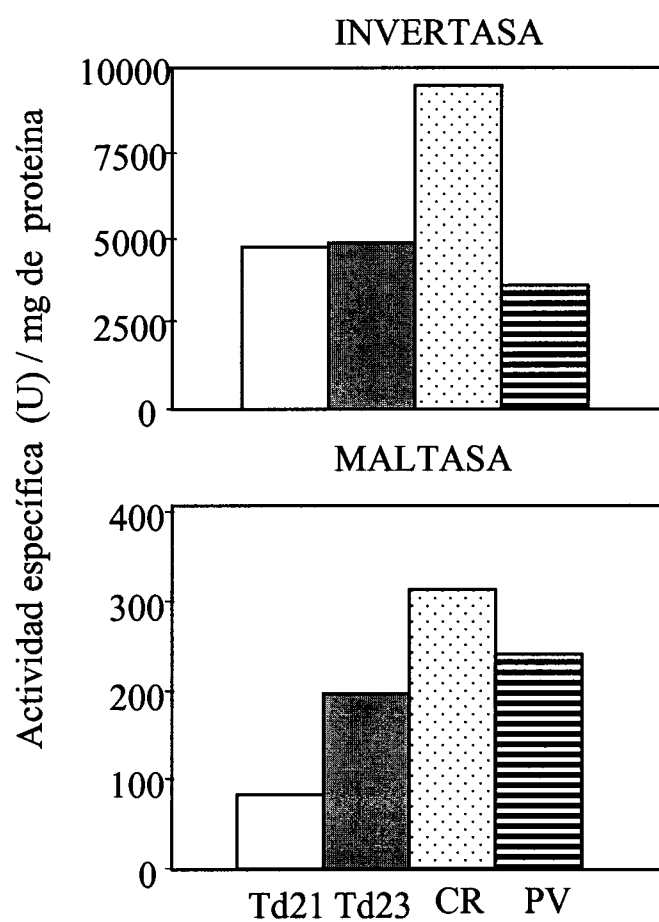
60

65



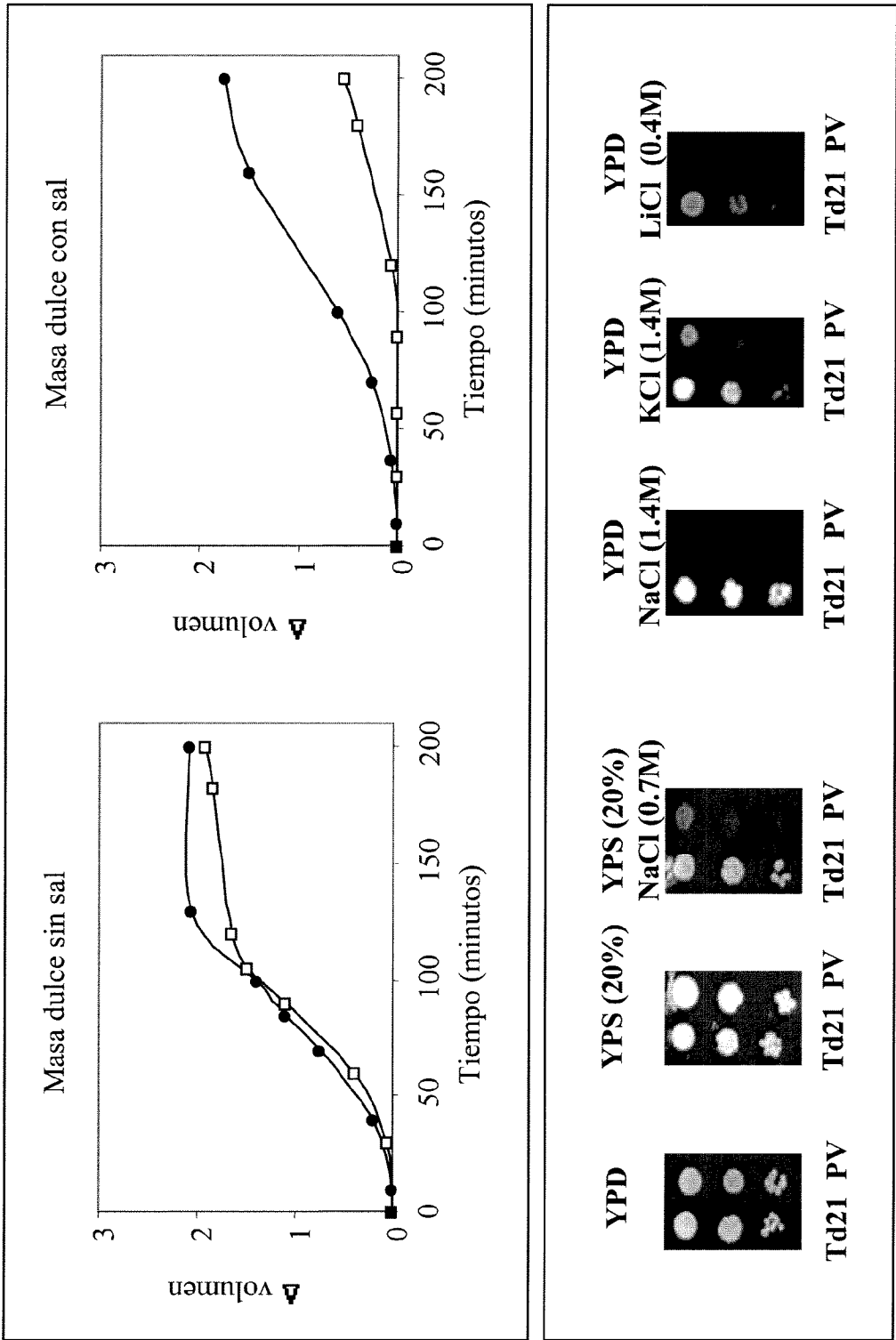
IGC5321(●) o IGC5323 (○) Cinta Roja (■) y Plus Vital (□)

Figura 1



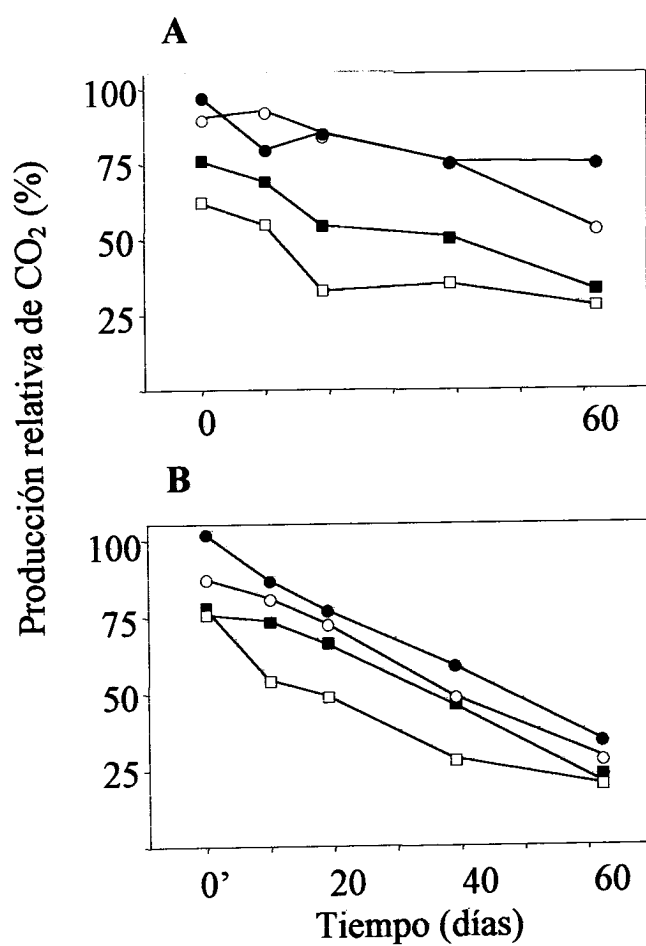
IGC5321 (Td21), IGC5323 (Td23), Cinta Roja (CR) y Plus Vital (PV)

Figura 2



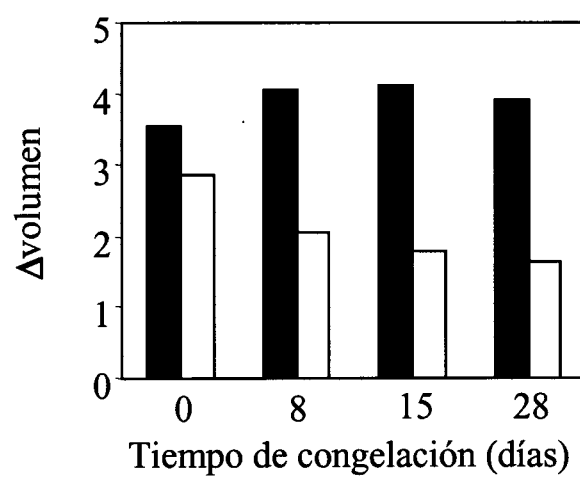
Plus Vital (□, PV) e IGC5321 (●, Td21)

Figura 3



IGC5321(●), IGC5323 (○), Cinta Roja (■) y Plus Vital (□)

Figura 4



IGC5321 (barras negras) o Plus Vital (barras blancas)

Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 183 749

⑫ Nº de solicitud: 200102067

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.09.2001

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: A21D 8/04, C12N 1/16 // (C12N 1/16, C12R 1:85)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 268012 A1 (UNIVERSAL FOODS CORP) 25.05.1988, reivindicaciones 1-7,9-10,12.	1-7
A	US 3830938 A (MORIKAWA) 20.08.1974, reivindicación única; columna 3, líneas 60-65.	1,4-5
A	JP 58-155039 A (ORIENTAL YEAST CO LTD) 14.09.1983, recuperado de WPI (World Patent Index) .ºn line". Nº acceso: 1983-797618 [25]. DW: 198343. Resumen de la Base de Datos.	
A	CA 2058200 A (LABATT LTD JOHN) 21.06.1993, recuperado de WPI .ºn line". Nº acceso 1993-28870 [37]. DW: 199337. Resumen de la Base de Datos.	
A	JP 06-078754 A (NIKKA UISUKII KK) 22.03.1994, recuperado de PAJ (Patent Abstracts of Japan) .ºn line". Resumen de la Base de Datos.	
A	JP 56-144036 A (SANKYO FOODS KK) 19.06.1984, recuperado de WPI .ºn line". Nº acceso 1984-174737 [28]. DW: 198428. Resumen de la Base de Datos.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.11.2002

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/1